

***Haematococcus pluvialis*: CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO CAROTENOGÊNICA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

REIS, Daiane¹; MACHADO JR., Francisco¹; OLIVEIRA, Kelly¹, TREVISOL, Thalles¹, BURKERT, Carlos André², BURKERT, Janaína²

¹Universidade Federal do Rio Grande – daiane.felixreis@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Engenharia de Bioprocessos – jfmb@vetorial.net

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos unicelulares fotossintéticos, que vivem em ambientes salinos ou de água doce, convertem luz, água e dióxido de carbono em biomassa (MORAIS, 2006). Entre todas as classes de corantes naturais, os carotenóides são os mais difundidos e são essencialmente produzidos no fitoplâncton, nas microalgas e plantas (LORENZ; CYSEWSKI, 2000).

Haematococcus pluvialis é uma microalga caracterizada por ser unicelular, flagelada e produzir cistos, os quais são considerados geralmente como uma resposta às condições desfavoráveis do meio. A formação de cistos é frequente e acompanhada por uma mudança da cor verde para alaranjada ou vermelha (GOODWIN, 1992). Outra importante característica desse micro-organismo é produzir astaxantina como principal carotenoide.

A astaxantina é um pigmento vermelho-alaranjado, empregado na avicultura e na aquicultura, sobretudo na indústria de produção de rações para peixes e crustáceos, a qual utiliza principalmente este carotenoide sintético (GOODWIN, 1992). Esse pigmento pode ser produzido por síntese química ou biotecnológica, porém a forma sintética pode conter configuração diferente da natural, possibilitando uma perda na atividade biológica. Os corantes derivados de fontes naturais são bioativos, e por esse motivo há um grande interesse no uso dos mesmos, como é o caso da astaxantina, licopeno e β -caroteno (RODRIGUEZ-SAIZ et al., 2010). Essa característica de bioatividade constitui uma oportunidade para a produção de astaxantina natural por *H. pluvialis*. O objetivo desse trabalho foi a obtenção de biomassa e carotenóides de *H. pluvialis* comparando diferentes meios de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem da microalga *H. pluvialis* foi doada pela Coleção de Microalgas Elisabeth Adair, Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas da Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ. Os cultivos estoque foram mantidos em fotobiorreatores de 1 L a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sob constante iluminância de $111 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ em meio de cultivo *Bold Basal Medium* (BBM) (DONG; ZHAO, 2004). Os experimentos foram realizados com cinco meios de cultivo: BBM, BBM e glicose (ONCEL et al., 2010), BBM e acetato de sódio (GHIGGI, 2007), BAR (*Barbera Medium*) (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUÑOZ, 2004) e BG-11 (*Blue-Green Medium*) (RIPPKA et al., 1979) sob temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em fotobiorreatores de 1 L com aeração por borbulhamento de ar de $340 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e sob iluminância constante de $444 \mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 15 dias. Inicialmente, o pH foi ajustado para 7,0 e os meios de cultivo foram adicionados de 10% de

volume de inóculo. A biomassa foi avaliada através de leitura diária da absorvância em espectrofotômetro a 560 nm utilizando espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China) (ONCEL *et al.*, 2010). A conversão da absorvância em biomassa foi realizada utilizando uma curva padrão para a microalga.

Para a determinação da concentração de carotenoides totais foi realizada ruptura química com dimetilsulfóxido (DMSO) e extração de acordo com FONSECA *et al.* (2011), após 15 dias de cultivo. A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro a 474 nm usando a absorvância específica para carotenoides totais em éter de petróleo de 2100 (CHUMPOLKULWONG *et al.*, 1997; DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUÑOZ, 2004). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados apresentados correspondem à média dos valores obtidos, que foram analisados através de análise de variância ($p < 0,05$) e teste de Tukey, com o auxílio do programa *Statística 7.0*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 1 apresenta os resultados do crescimento celular em diferentes meios de cultivos de *H. pluvialis*. O meio de cultivo que alcançou a maior concentração de biomassa, destacando-se dos demais, foi o BBM e acetato de sódio alcançando $1,18 \text{ g.L}^{-1}$ no segundo dia de cultivo. Comparando com dados disponíveis para *H. pluvialis* pode ser citado o trabalho de LABABPOUR *et al.* (2004), que utilizando a iluminância de $3,8 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a 20°C obtiveram crescimento celular máximo de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ após 8 dias de cultivo em meio *Kobayashi*.

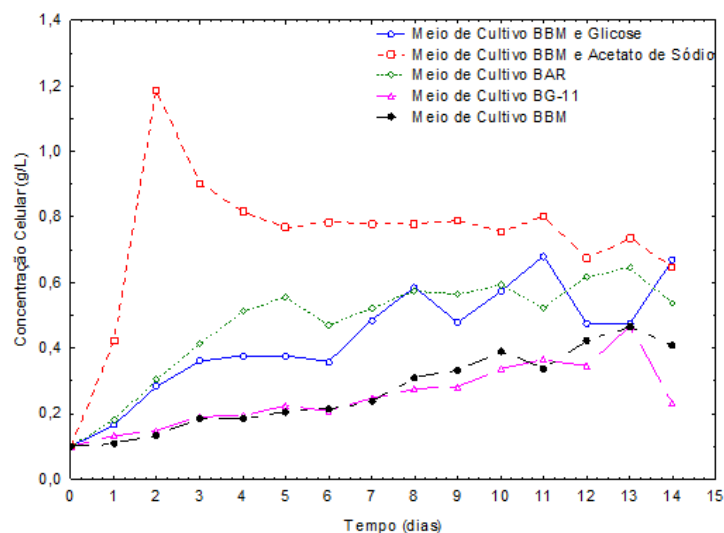


Figura 1: Crescimento celular de *H. pluvialis* em diferentes meios de cultivo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sob ilumin\u00e2ncia constante de $444 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e borbulhamento de ar de 340 mL min^{-1} durante 15 dias.

A microalga *H. pluvialis* pode utilizar algumas fontes de carbono org\u00e2nicas em pequenas quantidades (DONG; ZHAO, 2004). Dentre estas, destacam-se o acetato de s\u00f3dio e a glicose, pois aumentam a biomassa e a produ\u00e7\u00e3o total de astaxantina (OROSA *et al.*, 2005), corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho. Por outro lado, DONG; ZHAO (2004) observaram que a *H. pluvialis* possui uma capacidade limitada de metabolizar glicose, apresentando baixos

níveis de produção de biomassa, podendo isto ter exercido influência direta no crescimento no meio de cultivo BBM e glicose.

Quanto à produção de carotenóides, pode-se observar através da Tabela 1 que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os meios de cultivo estudados, sendo que os meios de cultivo BAR e BBM apresentaram valores de produção carotenogênica inferiores quando comparados aos meios BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11. Os resultados de carotenoides encontrados nesse trabalho foram semelhantes, porém superiores aos relatados na literatura. DOMINGUEZ-BOCANEGRA *et al.* (2007) encontraram $2000 \pm 100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de astaxantina para *H. pluvialis* para o meio de cultivo BG-11 a 28°C sob iluminação constante de $177 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 7 dias.

Tabela 1: Extratos carotenogênicos em diferentes meios de cultivo (média \pm desvio-padrão)*

Meio de Cultivo	Carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$)
BBM e glicose	$2635,38 \pm 397,92^a$
BBM e acetato de s\u00f3dio	$2623,12 \pm 183,15^a$
BG-11	$3026,66 \pm 286,95^a$
BAR	$1300,38 \pm 153,16^b$
BBM	$1295,55 \pm 237,55^b$

* Letras distintas representam que h\u00e1 diferen\u00e7a significativa ($p < 0,05$)

4. CONCLUS\u00d5ES

A *H. pluvialis* apresentou potencial para produ\u00e7\u00e3o de carotenoides a partir de diferentes meios de cultivo, sendo que o meio que se mostrou mais apropriado para este fim foi BBM e acetato de s\u00f3dio, pois apresentou o maior crescimento celular. A produ\u00e7\u00e3o carotenog\u00eanica alcan\u00e7ada nos meios de cultivo BBM e glicose, BBM e acetato e BG-11 n\u00e3o apresentaram diferen\u00e7as significativas entre si.

5. REFER\u00caNCIAS BIBLIOGR\u00c1FICAS

CHUMPOLKULWONG, N.; KAKIZONO, T.; NAGAI, S.; NISHIO, N. Increased astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* mutants isolated as resistant to diphenylamine. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, JAP\u00c3O, v. 83, n. 5, p. 429-434, 1997.

DOM\u00cdNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MU\u00d1OZ, J. A. Astaxanthin hyperproduction by *Phaffia rhodozyma* (now *Xanthophyllomyces dendrorhous*) with raw coconut milk as sole source of energy. **Applied Microbiology Biotechnology**, Alemanha, v. 66, n.3, p. 249-252, 2004.

DOMINGUEZ-BOCANEGRA, A.R., PONCE-NOYOLA, T., TORRES-MU\u00d1OZ, J.A. Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. **Applied Microbiology Biotechnology**, Alemanha, v. 75, n. 4, p. 783-791, 2007.

DONG, Q.; ZHAO, X.M. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. **Catalysis Today**, Estados Unidos, v. 98, n.4, p. 537-544, 2004.

FONSECA, R.A.S.; RAFAEL, R.S.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V.; BURKERT, J.F.M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, Estados Unidos, v.10, n.7, p.1165-1171, 2011.

GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantina por *Haematococcus pluvialis***. 2007. 119 f. Dissertação de mestrado em Processos Biotecnológicos. Universidade Federal do Paraná, UFPR. Curitiba, PR.

GOODWIN, T. W. Distribution of Carotenoids. *Methods in enzymology. Carotenoids*, part A: Chemistry, separation, quantitation and antioxidation, v. 213, 1992, p. 167-172.

LABABPOUR, A., HADA, K., SHIMAHARA, K. KATSUDA, T., KATOH, S. Effects of nutrient supply methods and illumination with blue light emitting diodes (LEDs) on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japão, v. 98, n. 6, p. 452–456, 2004.

LORENZ, T., CYSEWSKI, G. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. TIBTECH. **Elsevier Science Ltd.** Reino Unido, v.18, n. 4, p. 160-167, April, 2000.

MORAIS, F.L. **Carotenoides: características biológicas e químicas**. 2006. 70 f. Monografia do Curso de Qualidade em Alimentos. Universidade de Brasília. Brasília - DF.

ONCEL, S.S.; IMAMOGLU, E.; GUNERKEN, E.; SUKAN, F. V. Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Reino Unido, v. 86, n. 3, p. 414–420, 2011.

OROSA, M.; FRANQUEIRA, D.; CID, A.; ABALDE, J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. **Bioresource Technology**, Estados Unidos, v. 96, n. 3, p. 373–378, 2005.

RIPPKA, R.; DERUELES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, Reino Unido, v.111, n. 2, p. 1-61, 1979.

RODRIGUEZ-SAIZ, M.R.; FUENTE, J.L.; BARREDO, J.L. *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Alemanha, v. 88, n. 3, p. 645–658, 2010.

AGRADECIMENTOS

CAPES/Rede NANOFOTOBIOTEC e CNPq.